KISEP Otology Korean J Otolaryngol 1999;42:943-9

사람 정상중이점막 상피세포의 계대 배양과 분비세포로의 분화 유도

연세대학교 의과대학 이비인후과학교실,[1] 아주대학교 의과대학 이비인후과학교실[2]
이호기[1] · 윤주헌[1] · 박홍준[2] · 문성균[1] · 정명현[1] · 김희남[1]

Secretory Differentiation of Serially Passaged Normal Human Middle Ear Epithelial(NHMEE) Cells

Ho-Ki Lee, MD[1], Joo-Heon Yoon, MD[1], Hong-Joon Park, MD[2], Sung-Kyun Moon, MD[1], Myung-Hyun Chung, MD[1] and Hee-Nam Kim, MD[1]
[1]Department of Otorhinolaryngology, Yonsei University College of Medicine, Seoul,
[2]Department of Otolaryngology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : The purpose of this study was to subculture normal human middle ear epithelial (NHMEE) cells, investigate whether the subcultured NHMEE cells could have ability to differentiate into secretory cells, and establish a method to get cultured NHMEE cells for further study of human middle ear epithelial differentiation and secretion. **Materials and Method** : Freshly isolated epithelial cells from healthy middle ear mucosa were subcultured repeatedly after enzymatic disaggregation in serum-free medium on plastic tissue culture dishes. The subcultured cells were counted after every passage and tested for secretory differentiation in air-liquid interface (ALI) cultures. The apical secretion of cultured NHMEE cells were characterized by immunoblotting and Western blotting. **Results** : Attachment rate of subcultured NHMEE cells was over 70% through every passage. Cells proliferated by 22 fold from passage-1 to passage-2 (P-2), but passage-4 cells did not proliferate. P-2 NHMEE cells in ALI cultures was stained with mucin antibody (H6C5) but not b-tubulin antibody. Cultured NHMEE cells secreted mucin and lysozyme. **Conclusion** : P-2 NHMEE cell cultures retained many important features of normal epithelium and were suitable for conducting many studies of human middle ear epithelial cell biology including cell differentiation and secretion. **(Korean J Otolaryngol 1999;42:943-9)**

KEY WORDS : Normal human middle ear epithelial cell · Cell culture · Subculture · Mucin · Lysozyme.

서 론

중이점막 상피세포의 배양은 이비인후과에서 가장 흔한 질환의 하나인 삼출성 중이염을 포함한 중이점막 상피세포와 관련된 다양한 질환과 그 병리기전을 이해하는데 활용될 수 있으며 배양된 세포를 이용하여 환경 오염물질, 바이러스성 혹은 화학적 물질 및 세균의 영향을 연구할 수 있는 좋은 기회를 제공한다. 이와 같은 세포 배양을 이용한 연구는 실험에 필요한 충분한 양의 중이점막세포를 확보해야 하는데 이를 위해 세포의 계대 배양(subculture)을 필요로 한다.

논문접수일 : 1999년 3월 18일 / 심사완료일 : 1999년 6월 7일
교신저자 : 이호기, 120 - 752 서울 서대문구 신촌동 134 사서함 8044
연세대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (02) 361 - 8482 · 전송 : (02) 393 - 0580
E - mail : hokilee@yumc.yonsei.ac.kr

1976년 Drucker 등에 의해 중이점막 상피세포의 배양이 처음 시도되었으나 약 2주 동안 점막조직을 체외에서 생존시키는데 불과하였다.[1)] 그 후 1986년 van Blitterswijk 등이 쥐의 중이점막 세포를 계대 배양하는데 성공하였고[2)] 뒤이어 기니픽,[3)] gerbil,[4)] 친칠라[5)6)]에서도 계대 배양이 성공되었다. 그러나 실험동물의 중이점막 상피세포보다는 사람의 중이점막 상피세포를 직접 배양하여 실험하는 것이 인체의 생리적 상태에 더욱 가까운 결과를 얻을 수 있으나 사람에서는 충분한 양의 중이점막을 구하기가 어렵고 아직까지 사람에서 분화능력을 갖춘 중이점막 상피세포의 효과적인 배양법이 개발되지 않은 상태이다.

저자들은 사람의 정상 중이점막 상피세포의 계대 배양을 시도하여 계대 배양된 상피세포의 분화능력 여부와 그 분화의 특성을 밝혀 향후 사람 중이 상피세포를 이용한 실험에 필요한 분화능력을 갖춘 충분한 양의 중이점막 상피세포를

확보할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

중이점막 상피세포의 증식, 계대 배양

이소골 탈골 또는 외상성 고막천공 환자 10명에서 수술시 염증이 없는 건강한 중이 점막 조직을 중이갑각(promontory)에서 크기가 약 2×2 mm^2 정도로 채취하였다. 채취한 조직을 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, NY, USA)과 Ham's F12 nutrient mixture (F12, Gibco, NY, USA) 1 : 1로 혼합한 용액에서 1% pronase(type 14)를 첨가하여 18시간 정도 처치하였다. 상층에 떠 있는 세포를 플라스틱 용기에 평판한 후 37 ℃ 배양기에서 1시간 동안 배양하면 근육세포, 혈관내피세포, 섬유아세포는 대부분 플라스틱 용기에 부착하나 상피세포는 그 시간 동안 플라스틱에 부착하지 못하는 특성을 이용하여 상피세포만을 분리한 후 플라스틱 용기에 평판하였다. 배양액은 bronchial epithelial growth media(BEGM, Clonetics Co., MD, USA)을 기본으로 하여 호르몬과 각종 성장인자를 첨가하였다(Table 1). 배양액은 평판 하루 후에 갈아주며 그 다음은 2일에 한번씩 갈아주었다. 50 60% 합류(confluence)를 이루는 시점에서 trypsin/EDTA를 이용하여 세포들을 플라스틱 용기로부터 떨어뜨려 단세포로 만든 후 혈구계를 사용하여 세포의 수를 측정하였다. 연속적 배양을 하지 않는 세포들은 10% dimethyl sulfoxide (DMSO)가 들어 있는 배양액에 1×10 6 cells/ml의 농도로 부유시킨 후 액화질소에 얼려 두었다. 연속적 배양을 위한 상피세포를 2,000 cells/cm^2 밀도로 평판하여 passage-2 (P-2) 세포를 만들었다. Passage-3(P-3)와 passage-4 (P-4)도 같은 방법으로 만들었다. 각 passage별 세포의 플라스틱 용기에 붙는 부착율과 세포의 증식율을 측정하였다.

Table 1. Hormone supplemented culture media for subculture of human middle ear epithelial cell

Components	Concentration	Supplier
BEGM	1x	Clonetics Corp.
Insulin	5.0 μg/ml	Clonetics Corp.
Hydrocortisone	0.5 μg/ml	Clonetics Corp.
Epinephrine	0.5 μg/ml	Clonetics Corp.
Triiodothyronine	6.5 μg/ml	Clonetics Corp.
Transferrin	10 ng/ml	Clonetics Corp.
Epidermal growth factor	25 ng/ml	Collaborative Res.
All-trans retinoic acid	50 nM	Sigma
Bovine pituitary extract	1% v/v	Pel Freez
Gentamycin : Amphotericin	50 μg/ml : 50 ng/ml	Clonetics Corp.
Bovine serum albumen	1.5 μg/ml	Sigma

*BEGM : Bronchial epithelial cell growth medium

배양된 세포의 면역세포화학염색

배양된 세포가 상피세포임을 증명하기 위해서 이차 배양된 세포에서 cytokeratin, vimentin 및 von Willbrand factor에 대한 면역세포화학염색을 각각 시행하였다. 면역염색을 위한 슬라이드 제작을 위해, 일부 세포는 chamber slide (Lab-Tek Chamber slide, Nalge Nunc International, USA)에서 배양하였다.

일차항체로는 단클론성 mouse antihuman cytokeratin(1 : 100, DAKO, Denmark), vimentin(1 : 50, DAKO, Denmark), von Willebrand factor(1 : 50, DAKO, Denmark) 항체를 각각 사용하였다. 이차항체는 biotinylated antimouse rabbit IgG(1 : 200, Vectastain Elite ABC Kit, Vector Lab., CA, USA)를 사용하였다. 세포가 배양되어 있는 chamber slide를 100% methanol 200 ml와 30% H_2O_2 2 ml를 섞은 용액에 20분간 담궈 내인성 peroxidase을 제거한 후 비특이적 항원 항체 반응을 방지하기 위해 1 : 600으로 희석된 가토의 정상혈장을 20분간 처치하였다. 일차항체를 37℃에서 2시간 처치한 후 biotin이 부착된 이차항체를 30분간 처치하였다. Avidin-biotin-enzyme complex법으로 peroxidase를 부착시킨 후 diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)를 처리하여 갈색으로 발색시켰다. 대조염색은 Mayer's hematoxylin으로 시행하였으며 음성 대조염색으로는 일차항체를 non-immunized mouse IgG(Sigma, MO, USA)로 대치하고 나머지 순서는 동일하게 하였다.

상피세포의 분화유도를 위한 Air-liquid interface(ALI) 배양

연속 배양된 사람 중이 상피세포를, 호르몬과 각종 성장인자가 첨가된 무혈장 배양액(Table 2)에 부유하여 반투과성막(Transclear, Costar Corp., Cambridge, MA)에 평판하였다. 세포들은 첫 7일간은 배양액에 잠긴 상태로 두며 ALI를 만드는 7일까지 위 및 아래쪽 부분을 모두 격일로 갈아주었다. 그 후는 배양액은 아래쪽 부분만 매일 교환해 주며 위쪽은 배양액을 제거하여 공기에 노출시켰다. 배양은 37℃, 5% CO^2에서 진행하였다.

분화유도된 세포의 염색

16일간 배양한 중이점막 상피세포를 10% 중성포르말린에 고정한 후 2% 아가로스 젤에 샌드위치형으로 넣어 굳힌 후

Table 2. Hormone supplemented culture media for differentiation of human middle ear epithelial cell

Components	Concentration	Supplier
BEGM : DMEM	1 : 1 mixture	Clonetics Corp. : GIBCO
Insulin	5.0 μg/ml	Clonetics Corp.
Hydrocortisone	0.5 μg/ml	Clonetics Corp.
Epinephrine	0.5 μg/ml	Clonetics Corp.
Triiodothyronine	6.5 μg/ml	Clonetics Corp.
Transferrin	10 ng/ml	Clonetics Corp.
Epidermal growth factor	0.5 ng/ml	Collaborative Res.
All-trans retinoic acid	50 nM	Sigma
Bovine pituitary extract	1% v/v	Pel Freez
Gentamycin : Amphotericin	50 μg/ml : 50 ng/ml	Clonetics Corp.
Bovine serum albumen	1.5 μg/ml	Sigma

*BEGM : Bronchial epithelial cell growth medium
DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium

파라핀에 포매하여 5 μm 두께로 절단하였다. 절단된 조직들은 H & E 염색을 하여 관찰하였다. 다른 용기에 들어있는 ALI에서 자란 세포들을 면역세포화학염색을 하기 위해 다음과 같이 분리하였다. 배양된 중이점막 세포로부터 배양액을 제거하고 배양세포의 위 부분과 아래 부분을 phosphate-buffered saline(PBS)로 씻었다. 배양세포의 위 부분에 3x trypsin-EDTA, 0.1% protease 용액을 첨가하였다. 세포의 분리가 일어날 때까지 37℃에서 약 1 1.5시간 경과 후 세포들을 PBS에서 resuspension하여 혈구계로 개수를 세고 세포농도가 5×10^4 cells/200 μl 되도록 하여 cytospin 원심분리기(Cytospin3, Shandon, USA)로 500 rpm에서 5분간 원심분리 하여 슬라이드에 부착시킨 후 차게 한 아세톤과 메탄올을 1 : 1로 섞은 용액으로 고정시켰다. 섬모에 특이적으로 반응하는 β-tubulin 및 점액 항체 H6C5(a generous gift from Dr. Davis, University of North Carolina, NC, USA)[7]로 면역세포화학적 염색을 시행하였다. β-tubulin 및 점액 항체에 양성인 세포의 백분율은 총 2,000개의 세포와 그 중 양성인 세포의 수를 측정하여 구하였다.

점액 및 리소자임 분비의 면역적 검출 및 정량

분비된 점액과 리소자임은 배양 시작 후 9일, 12일, 14 일, 16일 배양세포들이 24시간 동안 분비한 양을 수집하였다. 배양된 사람 정상 중이 상피세포에서 분비물 측정을 위한 방법은 immunoblot assay를 이용하는 Gray 등[7]이 기술한 방법을 사용하였는데 이미 알고 있는 표준용액의 농도를 기준으로 표본용액의 농도를 상대적으로 구하는 방법으로 다음과 같은 순서로 진행하였다. 순수 인체점액(a generous gift from Dr. Davis, University of North Carolina, NC, USA)과 리소자임(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 표준으로 사용하여 점액은 300 ng/ml, 리소자임은 2 μg/ml의 표준용액을 각각 1.33배씩 계열 희석하였다. 세포 분비물 표본은 점액의 경우 1 : 50 희석액을, 리소자임의 경우는 표본 원액을 각각 2배씩 8회 희석하였다. 계열 희석된 표준용액과 표본용액을 Micro Plate 96 Well(Greiner GMBH, Germany)를 이용하여 나이트로 셀룰로즈막(Bio-Rad, Richond, CA, USA)에 blotting 시켰다. 비특이적 항원 항체 반응을 방지하기 위해 나이트로 셀룰로즈막을 5% milk TBST(0.02M Tris, 0.15M NaCl, 0.1% Tween) 용액에 1시간 동안 진탕하였다. 일차항체로 점액은 백서의 단클론성 항체인 H6C5(1 : 2,000, a generous gift from Dr. Davis, University of North Carolina, NC, USA)[7]를, 리소자임은 가토의 다클론성 항체(1 : 1,000, Dako, Capintera, CA, USA)를 사용하였다. 리소자임 항체의 특이성은 Western blot에 의해 확인하였다. 일차항체를 상온에서 2시간 동안 반응시킨 후 이차항체는 점액의 경우 horse-radish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG를, 리소자임의 경우 anti-rabbit IgG(Jackson ImmunoResearch Lab. Inc., West Grove, PA, USA)를 사용하여 30분간 반응시켰다. ECL kit(Amersham, Buckingamshire, UK)를 이용하여 화학발색 반응을 시킨 후 나이트로 셀룰로즈막을 Hyperfilm(Amersham, Buckin-gamshire, UK)에 노출시켜 현상하였다. Spectra Max 340과 SOFTmax® Pro ver. 1.1(Molecular devices corp., CA, USA)를 이용하여 표준용액의 표준곡선을 구한 후 표본용액의 점액과 리소자임의 농도를 상대적으로 측정하였다. 산출된 농도와 표본용액의 총 부피 및 각 용기 당 세포 수를 이용하여 10^6 세포 당 분비된 점액과 리소자임의 양을 구하였다. 각 실험결과는 같은 실험을 3번 이상 시행하였으며 평균±표준편차로서 나타내었다.

결 과

계대 배양된 중이점막 상피세포의 부착율 및 증식율

10명의 공여자로부터 얻은 건강한 중이점막을 수술 시 채취하여 상피세포만을 분리한 후 플라스틱 용기에 평판하였을 때 곰팡이나 이스트의 오염이 발생한 2예를 제외한 8 예에서 일차 배양된 세포들이 10 13일이 경과한 후 50 60% 합류를 이루었다. 이 세포들을 다시 분리하여 2,000 cells/cm^2 밀도로 플라스틱 용기에 평판하여 연속적 배양을 하였을 때

P-2 세포에서는 배양 7일째 50 60% 합류를 이루었다. 각 passage별 세포가 플라스틱 용기에 붙는 부착율은 P-2는 74.5±16%, P-3은 80.2±18%, P-4는 88.7±11%로 연속배양을 할수록 세포의 부착율은 증가하였다. 연속배양이 됨에 따라 각 passage별 세포의 증식율은 P-1에서 P-2는 22.1±6배, P-2에서 P-3은 5.7±3배, P-3에서 P-4는 1.6±0.3배의 증식을 보여 P-1에서 P-2로 계대 배양한 세포에서의 증식율이 가장 컸고 그 후는 세포의 증식이 급격히 감소하는 경향을 보였다(Table 3). P-4 세포는 증식이 일어나지 않을 뿐 아니라 세포 내에 공포(vacuole)가 생기면서 사멸되어가는 현상을 보였다.

이차 배양된 세포의 동정

면역세포화학염색상 모든 세포는 상피세포의 표식자인 cytokeratin에 강하게 염색되었다(Fig. 1A). 일부 세포에서는 vimentin의 발현이 관찰되었으나(Fig. 1B) 주로 cluster의 주변부세포, 즉 세포분열이 활발한 세포에서 발현되었다. 내피세포의 표식자인 von Willebrand factor에 양성인 세포는 없었다(Fig. 1C).

계대 배양된 중이점막 상피세포에서 분화유도의 형태적 관찰

계대 배양된 세포의 분화능력을 검사하기 위해 10^5개의 P-2 NHMEE 세포들(2×10^4 cells/cm^2)을 반투과성막(Transclear membrane, 24.5 mm, 0.45 μm pore size, Costar Corp., Cambridge, MA)에 평판하였다. Airliquid interface(ALI) 배양을 이용하여 세포의 분화를 유도시켰을 때 7일까지는 세포의 번식이 일어났으나 8일 이후부터는 세포번식이 관찰되지 않았다. 16일간 배양한 중이점막 상피세포를 반투과성막에 붙인 상태로 H & E 염색을 하여 관찰한 결과 세포는 1 2층을 형성하였고 세포에서 섬모는 관찰할 수 없었다(Fig. 2A). 일부에서는 세포 사이에 분리가 일어나 원개(圓蓋, dome)을 형성하고 있었다(Fig. 2B).

세포들을 PBS에서 resuspension하였을 때 P-2 세포는 배양용기 당 5×10^5개 이상의 세포를 얻을 수 있었다. 그러나 P-3와 P-4 세포는 세포의 증식이 잘 일어나지 않았다. 세포 중 일부를 세포 농도가 5×10^4 cells/200 μl 되도록 하여 cytospin 원심분리기를 이용하여 cytospin slide에 부착시킨 후 섬모에 특이적으로 반응하는 β-tubulin 및 점액 항체(H6C5)로 면역세포화학적 염색을 시행하여 관찰한 결과 β-tubulin 항체에 반응하는 세포는 관찰되지 않았고(Fig. 3A), 점액 항체에 양성인 세포는 전체 세포 중 15%를 차지하였다(Fig. 3B).

분화유도된 중이점막 세포에서 점액 및 리소자임 분비의 면역적 검출 및 정량

P-2 세포를 ALI 배양을 이용하여 분화를 유도시킨 후 배양세포들이 24시간 동안 분비한 양을 측정하였을 때 배양일에 따른 점액분비는 배양 시작 후 9일째 93.8±5.4 μg/10^6 cells을 분비하였고 점차 증가하여 12일째 97.8±1.4 μg/10^6 cells을 분비하였다가 14일째 199.8±8.1 μg/10^6 cells을 분비하여 12일째와 비교하여 2배 가량 증가하였고 16일째는 236.6±0.6 μg/10^6 cells를 분비하여 증가가 둔화되는 경향을 보였다(Fig. 4A).

P-2 세포에서 리소자임은 배양 시작 후 9일째 3.9±1.6 μg/10^6 cells을 분비하였으며 점차 증가하여 12일째 5.7±0.7 μg/10^6 cells, 14일째 8.8±0.9 μg/10^6 cells, 16일째 9.2±1.2 μg/10^6 cells를 분비하여 시간이 경과할수록 분비의 양이 증가하였으나 16일째는 증가가 둔화되는 경향을 보였다(Fig. 4B).

P-3 세포를 반투과성막(Trans-clear membrane)에 평판하였을 때에는 세포의 증식이 잘 일어나지 않아 반투과성막의 미세 구멍을 통해 배양액이 올라와 ALI 배양이 되지 않았고 세포에서 분비하는 분비물도 정량할 수 없었다.

Table 3. Attachment rate and expansion of serially passaged normal middle ear epithelial cells

Passage	Attachment rate(Mean±SD)	Passage change	Expansion (Mean±SD)
P – 1	Not measured	P – 1	
		↓	22.1±6 -fold
P – 2	74.5±16%	P – 2	
		↓	5.7±3 -fold
P – 3	80.2±18%	P – 3	
		↓	1.6±0.3 -fold
P – 4	88.7±11%	P – 4	

고 찰

세포 배양방법이 다양하게 개발됨에 따라 세포의 특성을 유지하면서 특정세포의 증식 혹은 분화를 시킬 수 있게 되어 최근 상기도 상피세포도 생체와 유사한 형태와 생리학적 및 생화학적 특성을 갖도록 분화를 유도할 수 있다. 현재 기도 상피세포의 배양은 submerged, suspension, floating, airliquid interface(ALI) 등의 많은 다양한 배양방법이 있으며[8] 지금까지의 대부분의 연구는 기니픽, 쥐, 햄스터, 가토, 소 등의 동물 기도 상피세포를 이용하여 왔다.[9)10)11)] 중이점막의 상피세포는 쥐나 가토와 같은 실험동물에서 이미 배양법이 확립되어 실험재료로 사용되고 있고 1993년 Herman 등[12]

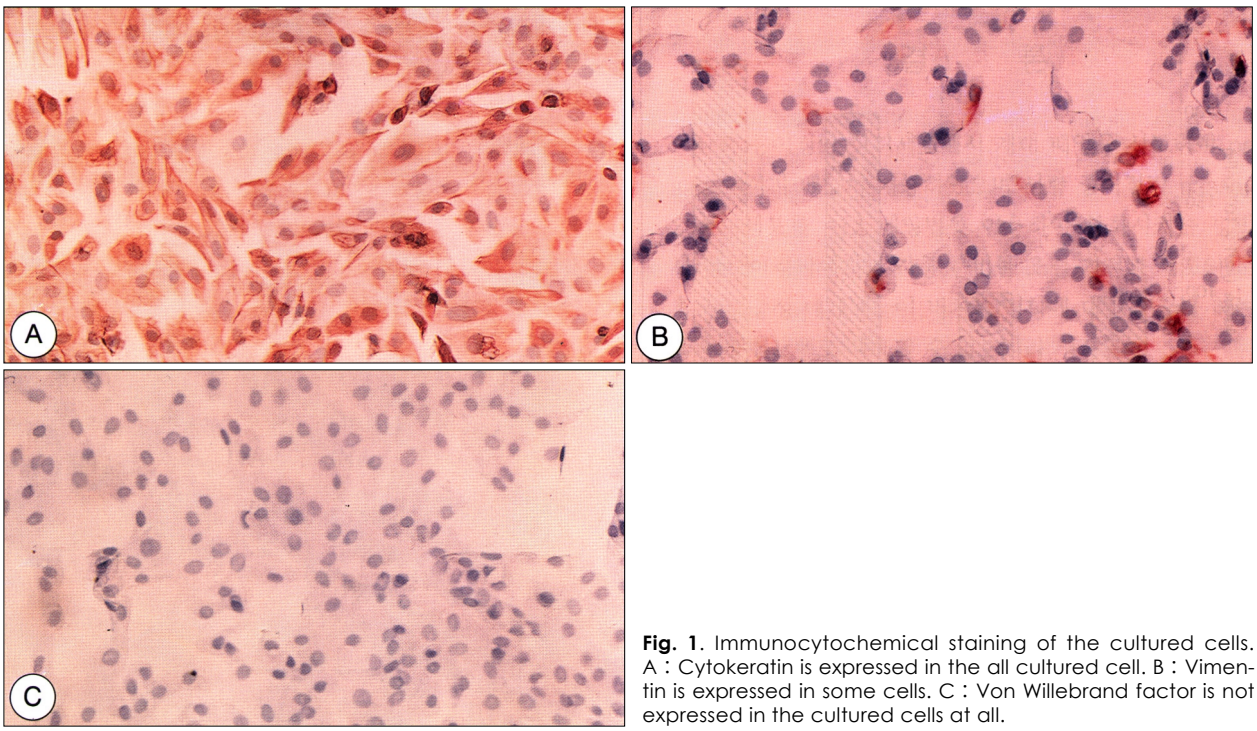

Fig. 1. Immunocytochemical staining of the cultured cells. A : Cytokeratin is expressed in the all cultured cell. B : Vimentin is expressed in some cells. C : Von Willebrand factor is not expressed in the cultured cells at all.

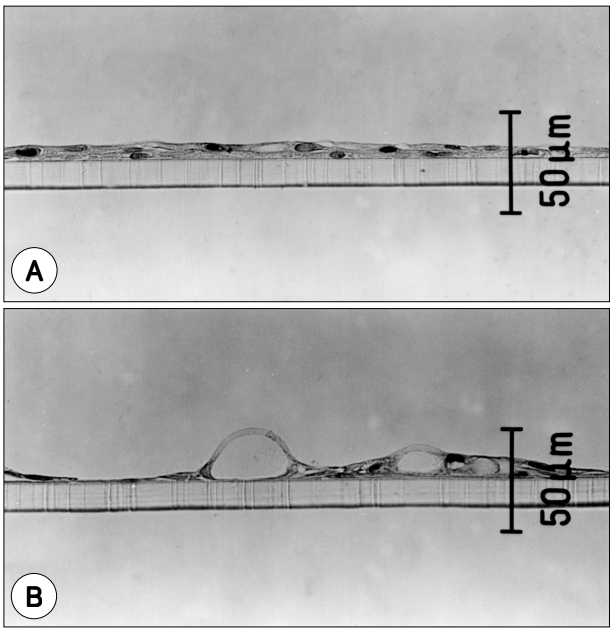

Fig. 2. Histological appearance of passage-2 normal human middle ear epithelial cells on day 16 cultures. Epithelial cells consist of one or two layers but do not show the cilia (Fig. A). Dome formation is found among cultured cells (Fig. B).

은 gerbil의 중이점막 세포계(cell line)를 만드는데 성공하였다. 그러나 실험동물의 중이점막 상피세포보다는 사람의 중이 점막 상피세포를 직접 배양하여 실험하는 것이 인체의 생리적 상태에 더욱 가까운 결과를 얻을 수 있다. 1992년 Hill 등은 사람 중이점막조직을 체외에서 일주일간 배양하

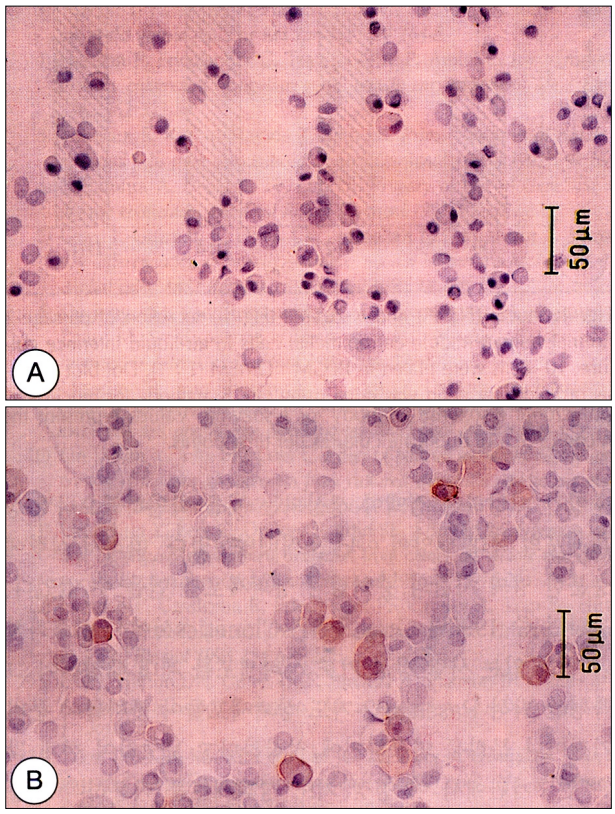

Fig. 3. Immunocytochemistry of passage-2 normal human middle ear epithelial cells on day 16 using β-tubulin (Fig. A) and mucin (Fig. B) antibody. Ciliated cells are not found but mucin-stained cells are seen.

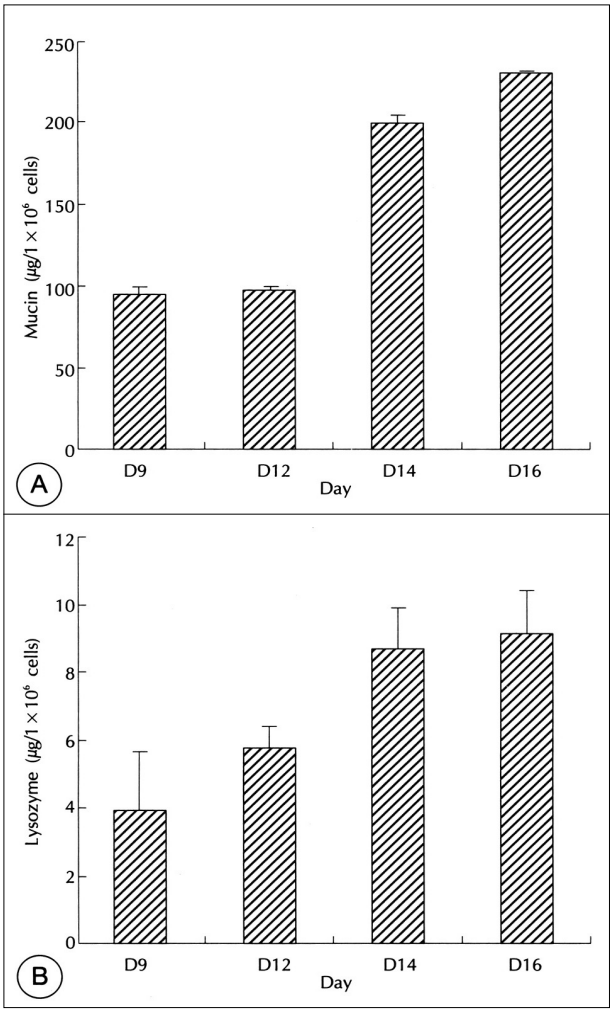

Fig. 4. Mucin (Fig. A) and lysozyme (Fig. B) secretion of passage-2 normal human middle ear epithelial cells in air-liquid interface culture. 10^5 cells were plated in BEGM : DMEM (1 : 1). Dot blot analy-sis of apical secretion was done using H6C5 antibody for mucin and polyclonal lysozyme antibody for lysozyme. Values represent the mean (±SD) of duplic-ate cultures per time points.

여 점액이 생성되는 것을 확인하였으나[13] 상피세포의 계대 배양이 아닌 조직배양이었다. 따라서 실험에 충분한 양의 사람의 중이점막 상피세포를 얻을 수 없었다. 그러던 중 1996년 Gray 등[7]은 Clonetics사에서 상품화하여 팔고 있는 사람 정상 기도 상피세포를 계대 배양하여 그 특성을 밝혀 Passage - 2 기도 상피세포들이 분비물의 분비기전이나 분화를 연구하기에 적합하다고 보고하여 현재 많은 연구기관에서 이 정상 기도 상피세포를 이용하여 각종 분비물의 조절 기전과 세포의 분화 혹은 염증성 매개체들이 미치는 영향에 대한 연구가 진행되고 있다. Yoon 등[14]은 사람의 코점막 상피세포를 채취하여 기도 상피세포의 계대 배양에 사용되는 배양액을 이용하여 코점막 상피세포의 계대 배양에 성공하였고 최근 저자들은 사람 중이점막에서 분리한 중이 상피세포가 기도 상피세포에서 사용되었던 배양액에서 primary explant culture를 통하여 자랄 수 있음을 확인하였다.[15] 그러나 primary explant 배양법은 작은 조직을 이용하여 배양을 시작할 수 있다는 장점이 있지만 모든 조직표본에서 일차배양이 시작되지 않고, 많은 경우에 조직이 괴사되는 단점이 있어 보다 효율이 좋고 세포의 증식능력을 오래 유지할 수 있는 배양법의 개발이 필요로 하였다. 따라서 본 실험에서는 채취한 사람 중이점막 조직에서 상피세포만을 분리하여 세포의 증식 효율을 더욱 높이면서 계대 배양하고 배양된 세포가 분화능력을 유지하고 있는지를 알아 보았다.

일차 배양된 세포를 플라스틱 용기에 평판하였을 때 중이점막 상피세포의 플라스틱 용기에 붙는 부착율은 각 계대 배양에서 70% 이상으로서 배양용기에 콜라젠젤이 없이도 중이점막 상피세포가 잘 부착하여 자랄 수 있는 것을 확인할 수 있었다. 이차 배양된 모든 세포에서 상피세포의 표식자인 cytokeratin이 발현된 것으로 보아 배양된 세포는 상피세포인 것으로 확인할 수 있었다. 일부 세포에서 섬유아세포의 표식자인 vimentin이 발현되었는데 배양된 상피세포에서 섬유아세포의 표식자인 vimentin이 동시 발현되는 현상은 주로 분화가 되지 않은 세포에서 발현이 많이 되는 것으로 알려져 있다.[15]

계대 배양에 따른 세포의 증식율은 사람의 중이점막 상피세포를 연속배양 할수록 세포의 부착율은 조금씩 증가하였지만 증식율은 P - 1에서 P - 2는 22.1배로 증식한 후 그 후부터는 세포의 증식이 급격히 감소하였고 P - 4 세포는 증식이 일어나지 않을 뿐 아니라 사멸되어가는 현상을 보였다. 이는 사람의 코 점막 상피세포에서 P - 3까지 각 passage마다 약 20 30배의 세포가 증가된 Yoon 등[14]의 보고와 비교해 볼 때 중이점막 상피세포는 코 점막에 비하여 증식율이 떨어짐을 알 수 있었다. 중이점막 상피세포에서 세포 분화를 유도하기 위하여 P - 3 세포를 반투과성막에 평판하였을 때에는 세포의 증식이 잘 일어나지 않아 ALI 배양이 되지 않았고 세포에서 분비하는 분비물도 정량할 수 없었다. 따라서 사람의 중이점막에서 P - 3 이상의 세포를 이용한 실험을 위해서는 증식율이 더 높은 배양법의 개발이나 이미 개발된 gerbil의 중이점막 세포계와 같이 사람에서도 중이점막 세포의 특성이 유지되는 세포계의 개발이 필요할 것으로 생각된다.

본 실험에서 P - 2 NHMEE 세포들을 이용하여 반투과성막에서 분화 유도된 중이점막 상피세포에서 형태적 관찰을 하였을 때 배양된 중이점막 상피세포는 1 2층을 형성하였지만 세포에서 섬모는 관찰할 수 없었다. 또한 cytospin 슬라이드에 부착시킨 배양 세포들을 섬모에 특이적으로 반응

하는 β - tubulin 항체로 면역세포화학적 염색을 시행하여 관찰한 결과 β - tubulin 항체에 반응하는 세포는 관찰되지 않아 본 실험에 사용한 배양법으로는 섬모의 발생을 촉진할 수 없다는 것을 알 수 있었다. 그러나 점액 항체(H6C5)에 양성인 세포는 전체 세포 중 15%를 차지하여 본 실험 방법을 이용하여 사람 중이점막 상피세포를 점액 분비하는 세포로 분화 유도시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

본 실험에서 배양된 세포들 사이에 분리가 일어나면서 원개(圓蓋, dome)을 형성하고 있는 점은 세포에서 어떤 물질이 분비되고 있음을 시사한다. 상피세포에서 분비되는 분비물은 점액성과 장액성으로 나눌 수 있다. 저자들은 점액성 분비물의 대표로 점액을 선택하였고 장액성 분비물로는 리소자임, 락토페린, secretory IgA, secretory leukocyte protease inhibitor(SLPI) 등이 있는데[16] 저자들은 그 중 리소자임을 선택하여 백만개의 세포당 분비되는 양을 정량하였다. 중이점막 상피세포를 계대 배양한 후 ALI 배양을 이용하여 세포 분화를 유도시켰을 때 7일이 되면 세포의 증식이 완료되었고 배양세포들이 24시간 동안 분비한 양을 측정하였을 때 점액은 배양 시작 후 14 16일째 150 250 μg 정도의 충분한 양이 분비되었다. 리소자임의 분비는 배양 시작 후 9일째부터 꾸준히 증가하여 16일째는 증가가 둔화되어 점액과 유사한 분비 경향을 보였다. 따라서 향후 일정 시점에서의 세포 분비물의 결과를 추출할 때는 배양 14일 또는 16일째가 가장 적당한 시점으로 생각되었다. 이와 같이 계대 배양한 사람 중이점막 상피 세포 중 passage - 2 세포에서 immunoblot으로 정량 가능한 충분한 양의 점액과 리소자임이 분비되어 계대 배양된 사람 정상 중이점막 상피도 생체에서 분비되는 것으로 알려진 많은 분비물들을 분비한다는 것을 알 수 있었다.

본 배양법을 통하여 사람의 중이 상피세포를 이용함으로 인하여 실험동물의 제한점인 종간의 차이를 부분적으로 극복할 수 있게 되며 인체의 생리적 상태에 더욱 가까운 결과를 얻을 수 있다. 향후 사람 중이점막의 상피세포를 이용하여 이비인후과 질환 중 대표적인 질환으로 중이점막의 과분비가 발생기전의 하나로 알려져 있는 삼출성 중이염과 같은 질환에서 점막에서의 과분비가 차지하고 있는 역할을 알아 점액 과분비와 연관된 다른 질병의 발생기전을 밝히는데도 본 연구가 활용될 수 있을 것이다.

결　　론

사람 중이점막 상피세포에서 계대 배양을 시도하여 passage - 4까지 배양이 가능하였으며 사람 중이점막 passage - 2 상피세포를 ALI 배양법을 이용하여 분화시키는 방법은 사람 중이점막에서의 각종 분비물 조절 기전과 세포의 분화 혹은 염증성 매개체들이 미치는 영향에 대한 연구를 하는데 좋은 실험모델로 사용될 수 있으리라 생각된다.

중심 단어 : 사람 중이점막 상피세포 · 세포배양 · 계대 배양 · 점액 · 리소자임.

이 논문은 1998년도 연세대학교 학술연구비의 지원에 의하여 이루어진 것임.

REFERENCES

1) Drucker I, Weisman Z, Sade J. *Tissue culture of human adult adenoids and of middle ear mucosa. Ann Otol 1976;85:327-33.*
2) van Blitterswijk CA, Ponec M, van Muijen GNP, Wijsman MC, Koerten HK, Grote JJ. *Culture and characterization of rat middle-ear epithelium. Acta Otolaryngol (Stockh)1986;101:453-66.*
3) Takeno T, Hirakawa K, Harada Y. *Tissue culture of middle ear epithelium of the guinea pig. Ear Res Jpn 1988;19:164-6.*
4) Herman P, Friedlander G, Tran Ba Huy P, Amiel C. *Ion transport by primary cultures of mongolian gerbil middle ear epithelium. Am J Physiol 1992;262:373-80.*
5) Amesara R, Kim Y, Harada T, Juhn SK. *Primary cultures of middle ear epithelial cells from chinchillas. Eur Arch Otorhinolaryngol 1992;249:164-7.*
6) Nakamura A, DeMaria TF, Lim DJ. *Primary culture of chinchilla middle ear epithelium. Ann Otol Rhinol Laryngol 1991;100: 774-82.*
7) Gray T, Guzman K, Davis CW, Abdullah L, Nettesheim P. *Mucociliary differentiation of serially passaged normal human tracheobronchial epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 1996;14: 104-12.*
8) De Jong PM, van Sterkenburg MAJA, Kempenaar JA, Dijkman JH, Ponec M. *Serial culturing of human bronchial epithelial cells derived from biopsies. In Vitro Cell Dev Biol 1993;29A:379-87.*
9) Hesseling SC, van Blitterswijk CA, Lim DJ, DeMaria TF, Bakaletz LO, Grote JJ. *Effect of endotoxin on cultured rat middle ear epithelium, rat meatal epidermis, and human keratinocytes. Am J Otol 1994;6:762-8.*
10) Lin J, Kim Y, Juhn SK, Lees C. *Effect of platelet activating factor on secretion of mucous glycoprotein from cultured chinchilla middle ear epithelial cells. Eur Arch Otorhinolaryngol 1995; 252:92-6.*
11) Lin J, Kim Y, Lees C, Ondrey F, Juhn SK. *Effect of lipoxygenase inhi-bition on mucous glycoprotein secretion from chinchilla middle ear epithelial cells in vitro. Ann Otol Rhinol Laryngol 1996; 105:916-21.*
12) Herman P, Cassigena R, Friedlander PS, Grodet A, Tran Ba Huy P, Amiel C. *Middle ear cell line that maintains vectorial electrolyte transport. J Cell Physiol 1993;154:615-22.*
13) Hill J, Hutton DA, Green GGR, Birchall JP, Pearson JP. *Culture of human middle ear mucosal explants: Mucin production. Clin Otolaryngol 1992;17:491-6.*
14) Yoon JH, Kim KS, Kim SS, Lee JG. *Secretory differentiation of serially passaged normal human nasal epithelial (NHNE) cells: Mucin & lysozyme expression. Ann Otol Rhinol Laryngol (in press).*
15) Moon SK, Lee HK, Yoon JH, Chung MH, Kim HN. *Establishment of normal human middle ear epithelial (NHMEE) cell using serum-free media. Korean J Otolaryngol 1998;41:1365-71.*
16) Basbaum CB, Jany B, Finkbeiner WE. *The serous cell. Annu Rev Physiol 1990;52:97-113.*